長期水旱田輪作生態系在不同施肥處理之土壤微生物研究

Asif Hameed [1]、沈佛亭 [1]、林詩耀 [1]、黃欣怡 [1]、林毓雯 [2]、楊秋忠 [1]*

1 國立中興大學土壤環境科學系
2 行政院農業委員會農業試驗所
*聯繫人 e-mail：cyoung@mail.nchu.edu.tw

摘要

本研究為了實踐農業的永續集約化生產，在台灣台中市亞熱帶評估了 23 年長期(1996-2019 年)施用有機質肥料與化學肥料對水旱輪作水稻及玉米系統的糧食產量及土壤因素的影響。進行田間處理包括豬糞堆肥(CP)、化學肥料(CF)、無肥料(CK，對照)及堆肥及添加 1/3 與 2/3 氮素 (CP、CPN1 及 CPN2)、泥炭添加 1/3(PN1)及綠肥添加 1/3(GMN1)等共 7 個處理。本研究測試土壤性質包括 pH 值、電導率 (EC)、有機質 (OM)、養分、微生物代謝及利用擴增子(amplicon sequencing)測序分析原核生物(細菌和古細菌)組成。 結果顯示玉米在 CF、GMN1 和三種 CP(CP、CPN1 和 CPN2)的處理下，呈現顯著增產趨勢(斜率 132.2-156.1 kg h^{-1} yr^{-1} *** p <0.01)，而水稻產量顯示出非顯著的邊際改善(斜率 26.7-46.7 kg h^{-1} yr^{-1})或負結果(斜率 –16.52 kg h^{-1} yr^{-1} , CF)。土壤因素的主成分分析顯示在玉米-水稻輪作過程中， CP-CPN1-CPN2、CF-GMN1-CK 及 PN1 存在明顯的三個簇組(cluster)。基於 CP 的處理尤其改善了作物輪作期間的 OM、EC、微生物代謝和養分有效性。在玉米種植期間明顯的土壤微生物活動及細菌豐度。相比之下，水稻種植過程中發現有氧代謝低，細菌和古細菌物種豐富度、多樣性和均勻度高。 在 β 多樣性分析期間獲得的 CP-CPN1-CPN1 及 CF-GMN 處理的簇組與土壤因子的簇組一致，而 CK-PN1 的簇組顯示儘管營養有效性不同，但原核生物組成具有驚人的相似性。總之，在基於 CP 的長期施入下觀察到的玉米產量增加趨勢與同時酸化土壤的 CF 和 GMN1 改良劑相當。數量上佔優勢的好氧細菌似乎有助於養分循環，並促進玉米產量，而新陳代謝遲緩的多種原核生物的招募則限制了養分周轉，從而使水稻產量停滯不前。

關鍵字： 長期生態研究、水旱田輪作、有機質肥料、化學肥料、微生物、堆肥、泥炭、綠肥、土壤原核生物、植物生產力、永續農業

前言

台灣屬亞熱帶地區一年耕作多次，與溫帶歐美國家一年耕作一次的種植頻度不同，溫帶地區的長期生態研究(LTER)是否會有相同與不同的結論值得探索。台灣的密集式的農業耕作，問題較需重視。全球農地普遍面臨長期大量施用化學肥料，導致土壤酸化及退化的問題，引起土壤有機質降低、蟲害增加及養分不均衡，導致作物需大幅度增加施用化肥及農藥，在此惡性循環下將造成食品安全及糧食安全堪虞。

旱田玉米與水田水稻輪作是穀物生產集約化的永續方式(Timsina *et al*., 2010)。 輪作影響植物的氮供應(Witt *et al*., 1998)、土壤細菌群落結構 ru6 農業產量(Xuan *et al*., 2012)。早期的研究表明，在將好氧植物納入輪作後，氮回收率低或氮損失高(Weller *et al*., 2015；Fuhrmann *et al*., 2018)以及微生物群落組成的變化(Breidenbach and Conrad, 2015；Breidenbach *et al*., 2016, 2017)。然而，在玉米-水稻輪作系統中，糧食產量趨勢和土壤原核生物等土壤因子的敏感性及其對各種施肥方案的代謝反應仍未得到探索。目前的長期研究旨在了解這些方面，並確定亞熱帶土壤中玉米-水稻輪作農業可持續集約化的最佳施肥量。本文為了瞭解亞熱帶-熱帶的台灣永續農業(sustainable agriculture)的生產，在田間土壤管理有效達成永續的發展，農業長期生態研究在不同施肥(化學肥料及有機質肥料)對作物生產及土壤的影響值得深入探討(Hameed *et al*., 2023)。

材料與方法

長期不同施肥之水旱輪作水稻及玉米生態系田區，在 1995 年 8 月開始建立至今，此栽培系統每年均依照所設計相同之處理方式，其土壤、作物、肥料及田間設計如下：

1. 供試土壤

田間試驗設置於於台中縣霧峰鄉行政院農委會農業試驗所之 35 號試驗田，土壤為砂頁岩非石灰性新沖積土，七塊厝系，屬壤質土壤，1995 年 8 月試驗開始時，測定之土壤性質為：pH (1:1)為 5.3，陽離子交換容量為 7.4 cmol kg^{-1}，交換性鉀、鈣、鎂、鋁、鋅、錳、銅及鐵分別為 74、625、149、0.23、4.3、62、4.6 與 891 mg kg^{-1}，Bray No. 1 法可萃取磷為 14.8 mg kg^{-1}。

2. 水旱田選用相同之水稻及玉米作物品系

水稻 (*Oryza sativa* L., cv. TN No.67)：台農六十七號水稻，於每年第一期栽種。
玉米 (*Zea mays* L., cv. TN No.1)：台農一號飼料玉米，於每年第二期栽種。

3. 肥料種類及施肥推薦用量

(1)水稻施用三要素肥料之 N-P_2O_5-K_2O 用量為 120-60-60 公斤/公頃，所使用之化學肥料分別為硫酸銨、過磷酸鈣及氯化鉀，有機資材為：(1) 豬糞堆肥、(2) 綠肥一期水稻採用埃及三葉草、二期玉米採用田菁 (因不宜冬天生長，春作水稻只能用埃及三葉草) 及 (3) 泥炭。

(2)玉米施用三要素肥料之用量 N-P_2O_5-K_2O 為 140-80-80 公斤/公頃，所使用之化學肥料有尿素、過磷酸鈣與氯化鉀，有機資材為台灣農民常用之豬糞堆肥、田菁、埃及三葉草及不易分解之泥炭。

4. 田間設計處理

田間處理為七種施肥處理 (各四重複) 採用 RCBD 設計，磷及鉀肥均為同量，各處理如下：

(1) 無肥料(CK)：不施任何肥料資材。
(2) 化學肥料(CF)：施肥手冊推薦化學肥料施用量，做有機質肥料之相對含氮量比較。
(3) 堆肥(CP)：有機質堆肥處理，只有堆肥之氮，不加化學 N。
(4) 堆肥+N1(CPN1)：有機質堆肥處理，即堆肥外，加化學 N 肥之 1/3 量。
(5) 堆肥+N2(CPN2)：有機質堆肥處理，即堆肥外，加化學 N 肥之 2/3 量。
(6) 綠肥+N1(GMN1)：即綠肥外 (夏季以田菁、冬季以埃及三葉草)，加 1/3 化學 N 肥。
(7) 泥炭(P)+N1(PN1)：即泥炭外，加 1/3 化學 N 肥。

5.土壤採集及分析

(1)土壤理化性分析：

依水稻之分蘗期(RRS)與開花期(RFS)，玉米之齊膝期(MRS)與開花期(MFS)各別採樣二次。每處理每重複採五點土樣混合後裝於塑膠袋中帶回實驗室，於室溫下風乾後過篩並混合均勻，將土壤樣品放入塑膠袋中保存於 4℃冰箱中待用分析[7]，分析項目包括 pH 值、EC 值、有機質、有機碳、及有效性磷、鉀、鈣、鎂、銅、鋅。使用 mothur 計算了 Alpha 多樣性指數，包括觀察到的物種 (Sobs)、Chao 的物種豐富度 (Chao1) 和 Shannon 的多樣性 (H') 和均勻度 (J')。 稀疏曲線和 β 多樣性評估(Bray-Curtis 聚類熱圖和非度量多維尺度 (NMDS))是使用 VEGAN (Dixon 2003) 製作的。

(2) 利用擴增子(amplicon sequencing)測序分析土壤原核生物群落：

根據商業使用 DNA 分離試劑盒(UltraClean™ Power Soil MO BIO Laboratories, Inc., USA)提取 MFS 和 RFS DNA。S-D-Bact-0341-b-S-17(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 及 S-D-Bact-0785-a-A-21(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 用作 PCR 的位點特異性引物。 據報導這些引物通過擴增 16S rRNA 基因的 V3-V4 區域， 利用 16S 宏基因組測序文庫製備試劑盒(Illumina，San Diego，CA，USA)，使用上述具有 5' Illumina 接頭懸垂的引物生成擴增子。通過 Nextera XT 索引試劑盒(Illumina，聖地亞哥，加利福尼亞州，美國)將索引適配器整合到擴增子中。 通過 4200 TapeStation 系統(安捷倫科技公司，聖克拉拉，加利福尼亞州，美國)篩選擴增子的大小準確度。 將樣品與 MiSeq Reagent Kit v3(600 個循環)混合，加載到 MiSeq 盒中，並使用 MiSeq 平台(Illumina，聖地亞哥，加利福尼亞州，美國)進行雙端測序(2×300 bp)。

使用 Bowtie 2(Langmead and Salzberg, 2012)過濾配對末端原始 FASTQ 讀數以去除 Illumina PhiX 對照。 使用 Trimmomatic (Bolger *et al*., 2014) 移除平均質量值 <20 的序列以產生乾淨的讀數。 使用 FLASH 合併乾淨的雙端讀取 (Mago and Salzberg, 2011)。 低質量的尾巴和引物被 mothur 修剪和過濾 (Schloss *et al*., 2009)。 USEARCH 用於從過濾標籤中去除 PCR 嵌合體以生成有效標籤並構建具有 97% 序列同一性閾值的操作分類單元 (OTU) (Edgar, 2013)。 OTU 的分類學分配由 mothur 在參考 SILVA 數據庫 v132(Quast *et al*., 2013；Yilmaz *et al*., 2014)時進行。 通過 QIIME 分析分類群和等級豐度 (Caporaso *et al*. 2010)。 使用 mothur 計算了 Alpha 多

樣性指數，包括觀察到的物種 (Sobs)、Chao 的物種豐富度 (Chao1) 和 Shannon 的多樣性 (H') 和均勻度 (J')。 稀疏曲線和 β 多樣性評估(Bray-Curtis 聚類熱圖和非度量多維尺度 (NMDS))是使用 VEGAN (Dixon 2003) 製作的。

(3)統計分析

利用單因素方差分析 (ANOVA) 確定作物產量及土壤因素的統計顯著性 Tukey 使用 GraphPad Prism 的多重比較測試。通過基於 Pearson 相關矩陣的主成分分析 (PCA) 評估處理與變量(土壤化學和 AWCD 數據、多樣性指數、域級和門級分類群豐度)之間的關係。數據取自輪換的連續兩年(2017-2019)。值 >0.5 的有意義載荷在主成分的解釋中被認為是顯著的 (Manly, 1994)。繪製了將原始變量繪製為向量的雙標圖，以總結變量與兩個圖示軸之間的相關性(Nair and Ngouajio, 2012)。

結果及討論

作物產量的變化

通過線性回歸分析評估長期(1996-2019)施肥處理下的玉米和水稻產量(圖 1)。相比之下，在各種化肥投入下，水稻產量沒有顯著增長，但全量化學肥料處理 (CF) 呈下降趨勢。玉米對施用肥料的反應逐漸增加，其中施用堆肥+半量化肥(CPN1)之處理提高玉米產量，與全量化學肥料處理(CF) 相當。

據報導，玉米(Buhiniček *et al*., 2021；Nel *et al*., 1996)及水稻(Abdullah Al Mamun *et al*., 2021)的穀物產量存在空間和/或時間變化。作物基因型和/或農藝實踐也會影響玉米產量(Rizzo *et al*., 2022；Tollenaar, 1989；Nel *et al*., 1996；Buhiniˇcek *et al*., 2021)和水稻產量(Peng *et al*., 1999)。本研究確定了在亞熱帶玉米-水稻輪作系統中玉米產量的顯著處理與時間變異，及水稻產量的停滯反應。

土壤因子的變化

評估土壤因子的變化以作為長期肥料修正的指標。研究結果顯示玉米-MRS 的土壤 pH 在基於堆肥 (CP) 的處理介於 5.2-6.1 之間，在化學肥料(CF)及綠肥-GMN1 處理下酸化介於 4.5-5.4 之間。水稻-RFS (0.3)相比與玉米-MFS (0.9) 的土壤 pH 值偏差較高。在分析土壤因子時，在 PCA 雙標圖上觀察到 CP-CPN1-CPN2、PN1 和 CF-CK-GMN1 的不同分簇(圖 2)。與水稻-RFS (40.23%) 相比，PC1 解釋的變異比例在 玉米-MFS 中更高 (44.13%)，而它們的 PC2 軸表現出邊際變異(17.47 對 17.56%)。土壤大量營養元素(總 N、有效性磷和鉀)與玉米-MFS 和水稻-RFS 的 CP-CPN1-CPN2 簇組顯著 (p<0.05) 正相關。雖然有效性 Zn 與玉米-MFS 的 CP-CPN1-CPN2 簇呈正相關 (p<0.05)，pH、AWCD 及 EC 與水稻-RFS 的 CP-CPN1-CPN2 簇呈正相關 (p<0.05)。 雖然土壤有機質(SOM)和有效性 Ca 和 Mg 與 PN1 處理的玉米-MRS 呈正相關 (p<0.05)，與化學肥料 (CF) 相比，它們在 CP-、CPN1- 和 CPN2 處理的玉米-MRS 中的含量也較高。相比之下，有效性 Fe 和 Cu 與 玉米-MRS 的 CF-GMN1-CK 簇組呈正相關 (p<0.05)。 然而，沒有觀察到乙炔還原及有效性 Mn 含量與各施肥處理的顯著相關性。

長期研究發現，大多數測試的土壤因素(包括土壤 pH 值)在處理和栽培方面存在顯著差異。在化學肥料(CF) 施用下發生的土壤酸化可歸因於硝化作用釋放的質子(Wolcott *et al*., 1965；Bolan *et al*., 1991 ；Guo *et al*., 2010)。相比之下，豆科植物的固氮作用 (Nyatsanga and Pierre, 1973；Bolan *et al*., 1991)和硝化作用一起可能促成了施用綠肥-

GMN1 下的酸化。隨著土壤酸度的增加，大量/微量營養元素(鐵除外)的有效性下降(Truog, 1947)。與化學肥料(CF) 相比，基於堆肥(CP)的改良劑中檢測到的大量土壤 N 反映了前者 N 損失的減少。酸性 pH 有利於 Fe 的可用性 (Truog, 1947)。化肥 (CF)及 綠肥-GMN1 處理中的 Fe 改良土壤。 然而在 化肥(CF)和 綠肥-GMN1 施用下檢測到高有效性 Cu，因為酸性會促進 Cu 的有效性(Truog, 1947)。

據報導長期有機改良劑利用增加土壤的有機碳和養分容量來提高水稻產量(Bi *et al.*, 2009)。與此一致，與玉米-MRS 中的化肥(CF)處理相比，長期堆肥(CP)處理導致 EC 和 SOM 得到改善。除了 pH 值之外，EC 是塑造集約化溫室土壤中細菌群落的重要土壤因素(Kim *et al.*, 2016)。AWCD 及 EC 的同時顯示土壤微生物活動可能對玉米-MRS 中的電解物質有貢獻。土壤的高有效性 Ca 可能是泥炭沉積物的衍生效應(Arkhipov and Bernatonis, 2006)，而高土壤有機質(SOM) 可能代表泥炭-PN1 施用下有機物質的頑固性。

棲息在玉米-MRS 處理的土壤微生物的群落水平生理分析 (CLPP)

群落水平生理分析(CLPP) 已被廣泛用於評估土壤中的微生物群落多樣性(Koner *et al.*, 2022；Shen and Lin, 2021,；Chen *et al.*, 2021)。本研究棲息在玉米-MRS 中的微生物的 CLPP 是利用 Biolog EcoPlate 測定的分析。根據 Insam (1997) 對 EcoPlate 可用的生長基質進行分類以進行數據分析。 EcoPlate 數據的熱圖分析顯示，與水稻-RFS 相比，玉米-MFS 微生物的有氧代謝更高(圖 3a)。微生物代謝也隨植物生長階段(分蘗及開花)而變化，PCA 證實了這一點(圖 3b-c)。玉米-MFS 及水稻-RFS 的分蘗樣本進一步顯示了代謝活動的逐年分離。然而，沒有檢測到對肥料施入的新陳代謝有明顯變化。管理措施和季節是影響土壤微生物群落代謝的重要因素(Shen and Lin, 2021；Chen *et al.*, 2021；Anna *et al.*, 2017)。本研究的數據顯示生長階段及種植培養條件(水/旱)顯著影響玉米-MRS 土壤微生物的生理學。

土壤原核生物群落組成的變化

本研究利用 16S rRNA 基因擴增子測序研究了土壤原核生物群落中可能的波動，以了解為棲息在玉米-MRS 土壤中的微生物已獲得對比 CLPP 支結果。以 OUT (operational taxonomic units)是操作分類單位分析的標誌。有趣的是，56 個土壤樣本中觀察到的物種/OTU 的稀疏圖，每個樣本至少有 52,674 個序列(虛線垂直 x 軸截距)，顯示與玉米相比，水稻中的 OUT(操作分類單位)相對較高。與玉米-MRS 中的其他處理相比，基於堆肥(CP)的施入(CP、CPN1 和 CPN2)導致更多的 OTU。利用 PCA 研究肥料施用處理、多樣性指數及類群域水平豐度之間的關係(圖 4)。PC1 和 PC2 解釋的變異比例分別為 60.12%和 25.07%。細菌的代表與玉米-MFS 呈正相關 ($p<0.05$)，同時分別與 CP-CPN1-CPN2 及 CF-GMN1 簇建立進一步的正相關及負相關 ($p<0.05$)。相反的，Sobs、Chao1、H'、J'、Archaea 和未知分類群與水稻-RFS 呈正相關 ($p<0.05$)，其中前四個參數與 CF-GMN1 簇呈負(ns)相關。因此，雖然玉米土壤中的細菌豐度很高，但水稻土壤中的細菌和古細菌物種豐富度及多樣性卻很明顯。 CF/GMN1 施肥處理分別抑制了玉米和水稻種植過程中的細菌和古細菌。

Bray-Curtis 數據的分簇熱圖顯示了玉米-MFS 和水稻-RFS 的兩個主要演化支，主要顯示玉米-MRS 中離散的作物成分差異(圖 5a)。NMDS 圖顯示玉米-MFS 及水稻-RFS 內 CF-GMN1、CK-PN1 和 CP-CPN1-CPN2 的明顯聚類，顯示玉米-MRS 中處理方面的組成差異(圖 5b)。 我們在玉米-MRS 中檢測到分別屬於細菌和古細菌的 43 個和 6 個門，分為高豐度(5-30%，n=8)、中等(1-4%，n=8)及低豐度(<1 %, n=27) 分類群(表 S6)。玉米

-MFS 及水稻-RFS 樣品在 PC1 上彼此廣泛分離，大部分門位於水稻-RFS 佔據的象限(圖 6)。CF-GMN1、CK-PN1 和 CP-CPN1-CPN2 在玉米-MFS 及水稻-RFS 中的不同聚類通過 PC2 顯而易見。 PC1 及 PC2 解釋的變異比例分別為 40.59% 及 18.72%。Thaumarchaeota、Actinobacteria、Firmicutes、Planctomycetes、WPS-2、Chlamydiae 和 Dependentiae 與玉米-MFS 呈正相關 (p<0.05)。 Proteobacteria、Gemmatimonadetes、Chlamydiae、Dependentiae、Entotheonellaeota、Tenericutes 及 Halanaerobiaeota 與 CF-GMN1 簇呈負相關 (p<0.05)，而只有 WPS-2 與 CP-CPN1-CPN2 簇呈負相關 (p<0.05)。相反的，Acidobacteria、Bacteroidetes、Patescibacteria、Nitrospirae、Bacteria_unclassified、Cyanobacteria、Armatimonadetes、Spirochaetes、Elusimicrobia、Epsilonbacteraeota、BRC1、Hydrogenedentes、FCPU426、Zixibacteria、Fibrobacteres、WS4、Omnitrophicaeota、Kiritimatiellaeota、WS2、Nitrospinae、WORstonebacteriaer、Lentisphaeriae 、Fusobacteria、Crenarchaeota、Nanoarchaeaeota 及 Archaea_unclassified 與 RFS 呈正相關 (p<0.05)。 Rokubacteria、Latescibacteria、Dadabacteria 和 Deinococcus-Thermus 與 CF-GMN1 簇呈負相關 (p<0.05)，而 Chloroflexi 和 GAL15 與 CP-CPN1-CPN2 簇呈負相關 (p<0.05)。

通過分層聚類熱圖研究棲息在玉米-MRS 中的前 40 個細菌類群的屬及種水平豐度。雖然在屬水平上獲得了微生物組的兩個不同演化支，但這些演化支在物種水平上被解剖顯示出代表。基於超變 V3-V4 區域的分析顯示玉米- MFS 中的高豐度細菌和 RFS 中的高原核物種豐富度和多樣性。 在淹水稻田中，原核生物的豐度、多樣性和群落結構隨季節和長期施肥而波動(Ahn *et al*., 2012)。據記載，水淹水稻和非水淹玉米中存在大量細菌，隨後是古細菌(Breidenbach and Conrad, 2015；Breidenbach *et al*., 2016, 2017)。與單一栽培的玉米相比，意大利水稻的根際和大塊土壤顯示出較高的物種豐富度；然而，作物輪作對演替的貢獻不同(Maarastawi *et al*., 2018)。我們發現在連續兩年的輪換期間，棲息在玉米-MRS 中的細菌和古細菌門(分別為 30 和 4)發生了顯著變化。我們進一步發現，RFS 含有未充分探索的“低豐度”細菌和古細菌門(分別為 24 個和 3 個)，而玉米-FS 被發現可以容納充分探索的“高豐度”細菌門。這些原核生物門根據洪水狀態和/或肥料輸入發生顯著變化，而其餘分類群在數量上保持穩定。這些“高豐度”細菌門可能是玉米-MFS 微生物對 EcoPlate 底物進行活性代謝的驅動力。

Beta 多樣性分析顯示玉米-MRS 原核生物在管理方面及作物方面的組成差異，證實了之前關於短期玉米-水稻系統的發現(Breidenbach *et al*., 2016, 2017；Maarastawi *et al*., 2018；Frindte *et al*., 2020). 在 NMDS 圖中看到的 CF-GMN1 及 CP-CPN1-CPN2 的不同分簇也在土壤化學及 AWCD 數據的 PCA 雙標圖中看到，反映了生物和非生物因素之間的相關性。土壤 pH 值的變化強烈影響細菌群落，這顯然是由於細菌最佳生長所需的窄 pH 值範圍(Rousk *et al*., 2010)。土壤 pH 值很可能在塑造在 CF 及 GMN1 與 CP、CPN1 和 CPN2 處理下觀察到的不同原核生物群落方面發揮了重要作用。玉米-MFS 中高豐度的好氧銨氧化奇古菌 (Thaumarchaeota) 與之前的報告一致(Breidenbach *et al*., 2016)。水稻田是大氣甲烷的主要生物源(Liesack *et al*., 2000)，本研究發現在這種土壤中古細菌中產甲烷的廣菌門 (Euryachaeota) 佔優勢也就不足為奇。需要進一步的研究來驗證基於化學肥料(CP) 處理的對古生菌 Thaumarchaeota 及 Euryachaeota 的限制，因為抑制這些分類群有助於改善玉米-MRS 中的 N 損失和甲烷排放。

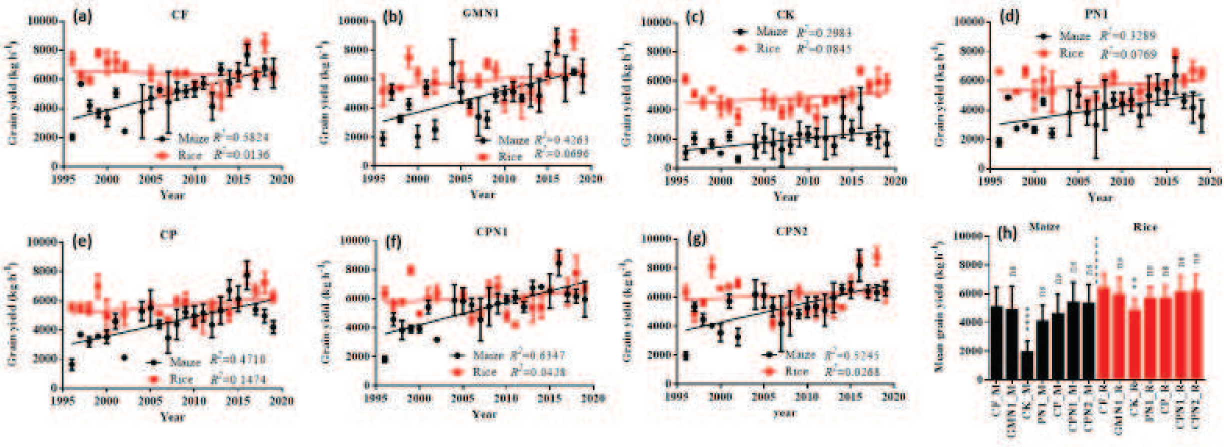

圖 1. 不同施肥條件下亞熱帶長期(1996-2019)玉米-水稻輪作農業生態系統的糧食產量進展。全量化肥(CF，a)、綠肥+1/3N(GMN1，b)、空白不施肥(CK，c)玉米(黑)和水稻(紅)籽粒產量的線性回歸分析 ，顯示泥炭+1/3 N(PN1，d)，豬糞堆肥(CP，e)，CP+1/3N(CPN1，f)及 CP+2/3N(CPN2，g)；數據點是平均產量 (n=4) ± s.d；*p* 值(***p*< 0.05、****p*< 0.01 和 *****p*< 0.0001)指的是斜率顯著非零。 ns，不顯著。

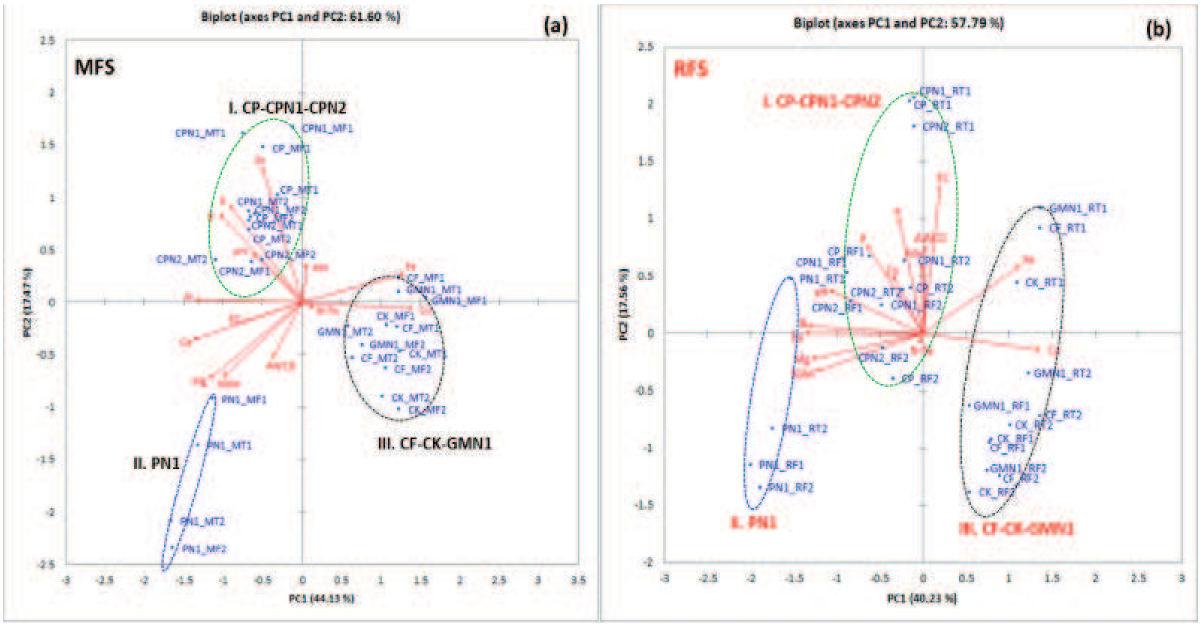

圖 2. 在特定施肥條件下維持的亞熱帶長期玉米-水稻輪作農業生態系統中土壤化學性質和微生物活動 (AWCD) 的變化。

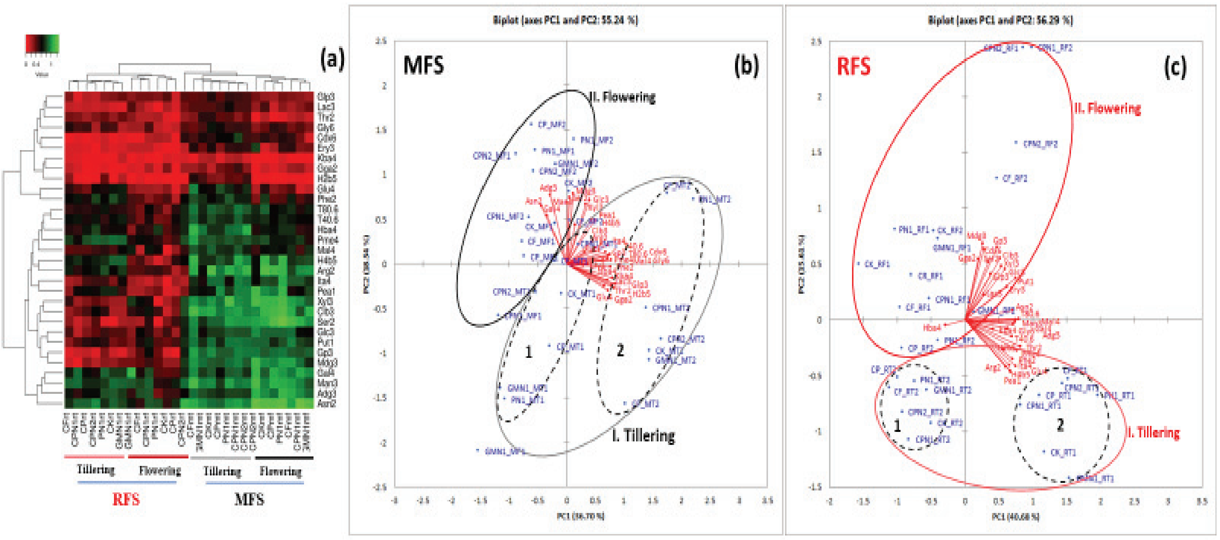

圖 3. EcoPlate 數據的熱圖 (a) 和主成分分析 (b-c) 顯示了玉米-水稻輪作期間不同微生物有氧代謝活動作為肥料改良和淹水的函數。玉米分蘗和開花(分別為 MTS 和 MFS)；水稻分蘗和開花(分別為 RTS 和 RFS)。

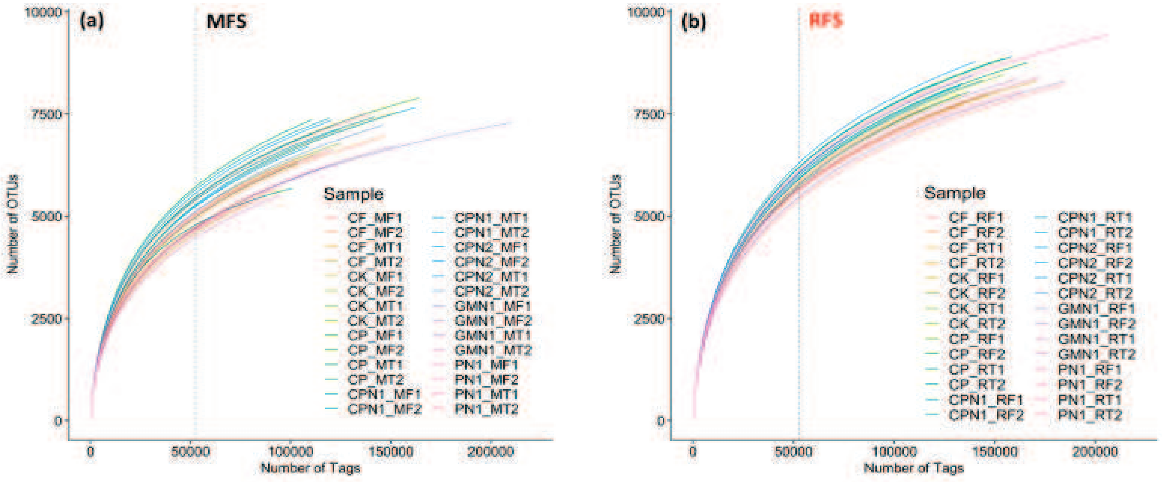

圖 4. 在特定施肥條件下維持的亞熱帶長期玉米-水稻輪作農業生態系統中 OTU 的變化。

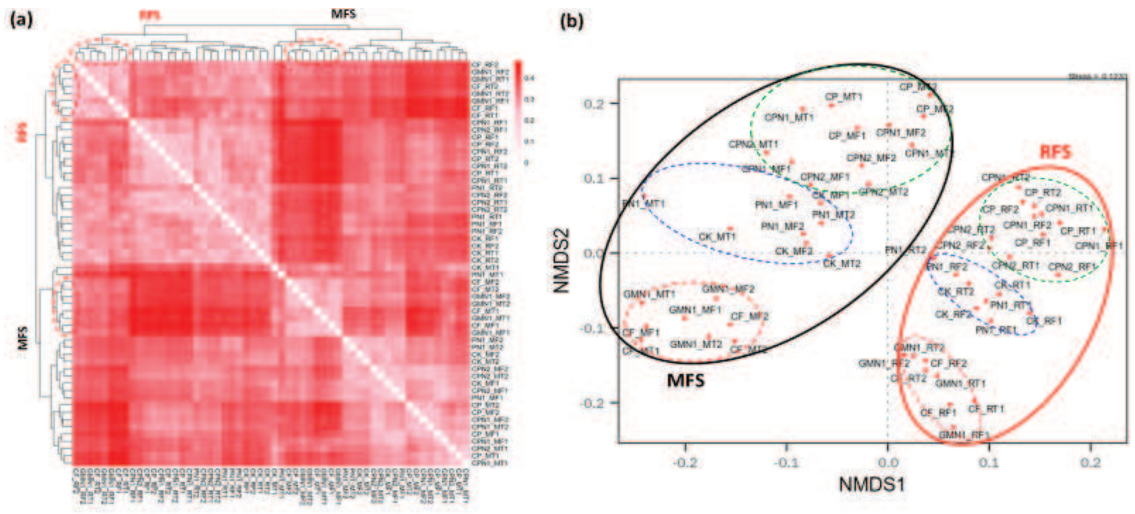

圖 5. 不同施肥條件下玉米-水稻輪作期間檢測到的土壤原核 OTUs 的 Beta 多樣性分析。 顯示了 OTU (a) 的 Bray-Curtis 成對組成差異的聚類熱圖和相關的非度量多維尺度 (NMDS) 模式 (b)。處理代碼在圖 2 中指定。

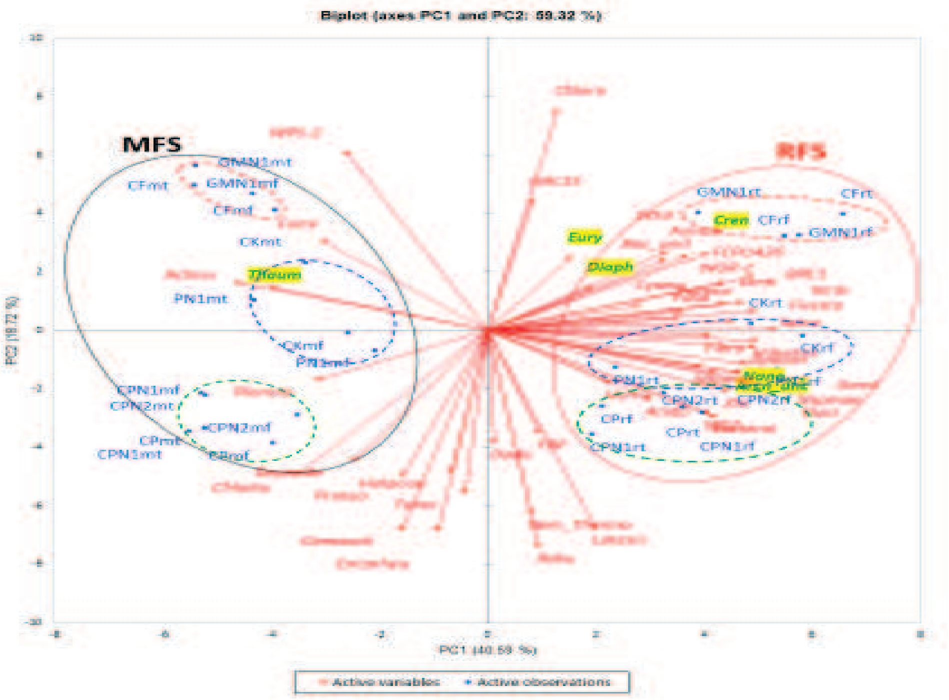

圖 6. 不同施肥條件下玉米-水稻輪作期間檢測到的土壤原核生物門豐度的主成分分析(PCA)。 PCA 基於 Pearson 相關矩陣。

結論

本研究檢測到玉米產量逐漸增加，而水稻產量在基於化學肥料(CF)、綠肥-GMN1及堆肥(CP)的長期玉米-水稻輪作期間似乎停滯不前。堆肥-CPN1 的長期應用提高了玉米和水稻的平均糧食產量，與各自的化學肥料(CF) 處理相當。基於堆肥(CP)的改良劑維持了土壤 pH 值、EC 和 SOM，顯著增加大量/微量營養元素，並提高了微生物活性和原核生物(細菌和古細菌)的多樣性。相比之下，CF 和 GMN1 應用降低了土壤 pH 值、EC、SOM、大量/微量營養元素和細菌多樣性。基於堆肥(CP)的改良劑分別抑制了玉米和稻田土壤中的氨氧化奇古菌 (Thaumarchaeota)及厭氧產甲烷廣古菌 (Euryachaeota)。本研究認為基於 堆肥(CP) 的玉米-MRS 是一種永續農業實踐手段，因為它改善了土壤養分、產量及土壤微生物組的多樣性。至於未來在化學肥料及綠肥處理對土壤 pH 的下降之影響，值得繼續觀察。

致謝：本文為本研究室 Hameed, A., Y.P. Chen, F.T. Shen, S.Y. Lin, H.I. Huang, Y.W. Lin, and C.C. Young. (2023) Applied Soil Ecology 184 , 共同發表之內容，本人經節錄部分內容書寫成中文。 https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104772。感謝行政院國家科學委員會長期支助本研究室計畫研究之經費及行政院農委會農業試驗所支持提供長期生態試驗田之研究。

參考文獻

1. Ahn, J.H., Song, J., Kim, B.Y., Kim, M.S., Joa, J.H., Weon, H.Y., 2012. Characterization of the bacterial and archaeal communities in rice field soils subjected to long-term fertilization practices. J. Microbiol. 50, 754–765.
2. Anna, G., Gawryjołek, K., Perzyński, A., Gałązka, R., 2017. Changes in Enzymatic Activities and Microbial Communities in Soil under Long-Term Maize Monoculture and Crop Rotation. Pol. J. Environ. Stud. 26, 39–46.
3. Arkhipov, V.S., Bernatonis, V.K., 2006. Distribution of calcium in peat deposits of the central part of Western Siberia. Eurasian Soil Sci. 39, 261–269.
4. Bi, L.D., Zhang, B., Liu, G.R., Li, Z.Z., Liu, Y.R., Ye, C., Yu, X.C., Lai, T., Zhang, J.G., Yin, J.M., Liang, Y., 2009. Long-term effects of organic amendments on the rice yields for double rice cropping systems in subtropical China. Agric. Ecosyst. Environ. 129, 534–541.
5. Bolan, N.S., Hedley, M.J., White, R.E., 1991. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. Plant Soil 134, 53–63.
6. Breidenbach, B., Blaser, M.B., Klose, M., Conrad, R., 2016. Crop rotation of flooded rice with upland maize impacts the resident and active methanogenic microbial community. Environ. Microbiol. 18, 2868–2885.
7. Breidenbach, B., Brenzinger, K., Brandt, F.B., Blaser, M.B., Conrad, R., 2017. The effect of crop rotation between wetland rice and upland maize on the microbial communities associated with roots. Plant Soil 419, 435–445.
8. Breidenbach B., Conrad, R., 2015. Seasonal dynamics of bacterial and archaeal methanogenic communities in flooded rice fields and effect of drainage. Front. Microbiol. 5.
9. Buhiniček, I., Kaučić, D., Kozić, Z., Jukić, M., Gunjača, J., Šarčević, H., Stepinac, D., Šimić, D., 2021. Trends in Maize Grain Yields across Five Maturity Groups in a Long-Term

Experiment with Changing Genotypes. *Agriculture 11*, 887.

10. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat. Methods 7, 335–336.
11. Chen, W.C., Ko, C.H., Su, Y.S., Lai, W.A., Shen, F.T., 2021. Metabolic potential and community structure of bacteria in an organic tea plantation. Appl. Soil Ecol. 157, 103762.
12. Dixon, P., 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. J. Veg. Sci. 14, 927–930.
13. Frindte, K., Zoche, S.A., Knief, C., 2020. Development of a Distinct Microbial Community Upon First Season Crop Change in Soils of Long-Term Managed Maize and Rice Fields. Front. Microbiol. 11.
14. Guo, J.H., Liu, X.J., Zhang, Y., Shen, J.L., Han, W.X., Zhang, W.F., Christie, P., Goulding, K.W.T., Vitousek, P.M., Zhang, F.S., 2010. Significant Acidification in Major Chinese Croplands. Science 327, 1008–1010.
15. Hameed, A., Y.P. Chen, F.T. Shen, S.Y. Lin, H.I. Huang, Y.W. Lin, and C.C. Young. 2023. Evaluation of a subtropical maize-rice rotation system maintained under long-term fertilizer inputs for sustainable intensification of agriculture. Applied Soil Ecology. Volume 184 , April 2023, 104772. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104772
16. Insam, H., 1997. A New Set of Substrates Proposed for Community Characterization in Environmental Samples. In: Insam, H., Rangger, A. (eds) Microbial Communities. Springer, Berlin, Heidelberg.
17. Kim, J.M., Roh, A.S., Choi, S.C., Kim, E.J., Choi, M.T., Ahn, B.K., Kim, S.K., Lee, Y.H., Joa, J.H., Kang, S.S., Lee, S.A., Ahn, J.H., Song, J., Weon, H.Y., 2016. Soil pH and electrical conductivity are key edaphic factors shaping bacterial communities of greenhouse soils in Korea. J. Microbiol. 54, 838–845.
18. Koner, S., Chen, J.S., Hsu, B.M., Rathod, J., Huang, S.W., Chien, H.Y., Hussain, B., Chan, M.W.Y., 2022. Depth-resolved microbial diversity and functional profiles of trichloroethylene-contaminated soils for Biolog EcoPlate-based biostimulation strategy, Journal of Hazardous Materials, 424. 127266.
19. Liesack, W., Schnell, S., Revsbech, N.P., 2000. Microbiology of flooded rice paddies. FEMS Microbiol. Rev. 24, 625–645.
20. Maarastawi, S.A., Frindte, K., Linnartz, M., Knief, C., 2018. Crop Rotation and Straw Application Impact Microbial Communities in Italian and Philippine Soils and the Rhizosphere of Zea mays. Front Microbiol. 9.
21. Manly, B.F.J., 1994. Multivariate Statistical Methods. A Primer, second ed. Chapman and Hall, London.
22. Nair, A., Ngouajio, M., 2012. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. Appl. Soil Ecol. 58, 45–55.
23. Nel, P.C., Barnard, R.O., Steynberg, R.E., de Beer, J.M., Groenveld, H.T., 1996. Trends in maize grain yields in a long-term fertilizer trial. Field Crops Res. 47, 53–64.
24. Nyatsanga, T., Pierre, W.H., 1973. Effect of Nitrogen-Fixation by Legumes on Soil Acidity.

Agron. J. 65, 936–940.

25. Peng S., Cassman, K.G., Virmani, S.S., Sheey, J., Khush, G.S., 1999. Yield potential trends of tropical rice since the relase of IR8 and the challenge of increasing the rice yield potential. Crop Sci. 39, 1552–1559.
26. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41, D590–D596.
27. Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. ISME J. 4, 1340–1351.
28. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7537–7541.
29. Shen, F.T., Lin, S.H., 2021. Priming effects of cover cropping on bacterial community in a tea plantation. Sustainability 13, 4345.
30. Truog, E., 1947. Soil Reaction Influence on Availability of Plant Nutrients. Soil Sci. Soc. Am. J. 11, 305–308.
31. Wolcott, A.R., Foth, H.D., Davis, J.F., Shickluna, J.C., 1965. Soil fertility and plant nutrition Nitrogen Carriers: I. Soil Effects. Soil Sci. Soc. Am. J. 29, 405–410.
32. Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2014. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. Nucleic Acids Res. 42, D643–648.

Study on Soil Microorganisms of Long-term Wetland and Upland Field Rotation Ecosystem under Different Fertilization Treatments

Asif Hameed[1], Yu-Pei Chen[2], Fo-Ting Shen[1], Shih-Yao Lin[1], Hsin-I Huang[1], Yu-Wen Lin [3] and Chiu-Chung Young [1]*

1 Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
2 Department of Public Health and Medical Technology, Xiamen Medical College
3 Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan
* Correspondence: ccyoung@mail.nchu.edu.tw

Abstract

In order to practice the sustainable intensification of agriculture, this study evaluated the effects of 23-year long-term (1996-2019) application of organic fertilizers and chemical fertilizers on grain yield and soil factors in wetland and upland rotation rice and corn systems in the subtropical region of Taichung, Taiwan. Field treatments including pig manure composting (CP), chemical fertilizers (CF), no fertilizer (CK, control) and composting with addition of 1/3 and 2/3 nitrogen (CP, CPN1 and CPN2), peat addition of 1/3 nitrogen (PN1) and green manure addition 1/3 nitrogen (GMN1), a total of 7 treatments. Soil properties tested in this study included pH, electrical conductivity (EC), organic matter (OM), nutrients, microbial metabolism, and prokaryotic (bacterial and archaeal) composition using amplicon sequencing. The results showed that under the treatments of CF, GMN1 and three CPs (CP, CPN1 and CPN2), maize showed a significant yield increase trend (slope 132.2-156.1 kgh-1 yr-1 *** p <0.01), while rice yield showed no significant marginal improvement (slope 26.7-46.7 kgh-1 yr-1) or negative outcome (slope –16.52 kgh–1yr–1). Principal component analysis of soil factors showed that there were three distinct clusters in CP-CPN1-CPN2, CF-GMN1-CK and PN1 during the corn-rice rotation process. CP-based treatments especially improved OM, EC, microbial metabolism, and nutrient availability during crop rotation. Significant soil microbial activity and bacterial abundance during maize cultivation. In contrast, rice cultivation was found to have low aerobic metabolism and high bacterial and archaeal species richness, diversity, and evenness. The cluster groups of CP-CPN1-CPN1 and CF-GMN treatments obtained during the β-diversity analysis were consistent with those of soil factors, while the cluster groups of CK-PN1 showed a surprising prokaryotic composition despite different trophic availability similarity. In conclusion, the trend of maize yield increase observed under long-term CP-based application was comparable to CF and GMN1 amendments that acidified soils simultaneously. Numerously dominant aerobic bacteria appear to drive nutrient cycling and promote maize yield, while recruitment of diverse prokaryotes with slow metabolism limits nutrient turnover, thereby stagnating the rice yield.

Keywords: long-term ecological research; wetland and upland field crop rotation; organic fertilizer; chemical fertilizer; microorganism; compost; peat; green manure; soil prokaryote; plant productivity; sustainable agriculture